

مجله دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد/ دوره ۱۴، شماره ۵/آذر و دی ۱۳۹۱/۵۳-۴۲

مقاله پژوهشی**طراحی و راه اندازی آزمون الایزا غیر مستقیم به منظور تشخیص عفونت ویروس اپشتن-بار بر اساس آنتی ژن gp125 کپسید ویروس**

دکتر رضا طاهرخانی^{۱*}، علی میرجلیلی^۲، فاطمه فرشادپور^۱، روحانی کارگر موخر^۳، سید مهدی بوتراپی^۴، رحمان عبدی زاده^۵

^۱ مرکز تحقیقات بیماری های عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران، ^۲ گروه بیوتکنولوژی، انستیتو تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، البرز، ایران، ^۳ گروه ویروس شناسی، انستیتو تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، البرز، ایران، ^۴ گروه علوم آزمایشگاهی، شرکت تولیدی تحقیقاتی کیت های تجاری پیشناز طب زمان، تهران، ایران، ^۵ گروه آنکال شناسی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز، اهواز، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۰/۸/۱۶ اصلاح نهایی: ۹۱/۵/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۱/۷/۱۶

چکیده:

زمینه و هدف: ویروس اپشتن-بار از خانواده هرپس ویروس ها، بوسیله تماس مستقیم با ترشحات عفونی منتقل می شود. در طی عفونت، آنتی بادی هایی از کلاس IgG و IgM علیه آنتی ژن کپسید ویروس تولید می شوند که در تعیین وضعیت عفونت نقش دارند. هدف از این مطالعه طراحی و راه اندازی آزمون الایزا برای تشخیص آنتی بادی های IgG و IgM علیه آنتی ژن کپسید ویروس اپشتن-بار بود.

روش بررسی: در این مطالعه تحقیقی-تولیدی، آزمون الایزا با استفاده از آنتی ژن کپسید ویروس gp125 بمنظور تشخیص آنتی بادی های IgG و IgM اختصاصی ویروس اپشتن-بار طراحی و راه اندازی شد. سپس ۱۰۱ نمونه سرمی با آزمون الایزا IgM (۲۶ نمونه مثبت و ۷۵ نمونه منفی) و ۱۰۵ نمونه سرمی با آزمون الایزا IgG (۹۸ نمونه مثبت و ۷ نمونه منفی) طراحی شده مورد آزمایش قرار گرفتند و جهت بررسی ویژگی، ۲۴ نمونه سرمی بیماران غیر متونوکلئوز عفونی استفاده گردید. نتایج حاصل با آزمون ایمنوفلورسنس (IFA) و کیت تجاری الایزا اکوتی پار-ایتالیا (Equipar Diagnostics -Italy) مقایسه شد. به منظور تجزیه و تحلیل داده ها از نرم افزار SPSS و آزمون مک نمار استفاده گردید.

یافته ها: حساسیت نسبی، ویژگی نسبی و میزان همخوانی آزمون الایزا IgM و آزمون الایزا IgG طراحی شده در مقایسه با کیت تجاری به ترتیب برابر ۹۲/۳٪، ۹۶٪ و ۹۵٪ - ۹۶/۶٪، ۸۸/۹٪ و ۹۵٪ بود. آزمون الایزا طراحی شده IgG زمانی که با آزمون IFA مقایسه گردید. به ترتیب دارای حساسیت، ویژگی و میزان همخوانی ۹۷٪، ۱۰۰٪ و ۹۷/۸٪ و ارزش اخباری مثبت ۱۰۰٪ بود.

نتیجه گیری: ماهیت آنتی ژن پوشش داده شده نقش مهمی در افزایش حساسیت و ویژگی دارد به عبارتی زمانی که در آزمون الایزا از آنتی ژن اصلی استفاده گردد آزمون ویژگی بالایی دارد (الایزا طراحی شده) اما زمانی که از آنتی ژن سنتتیک (کیت تجاری اکوتی پار-ایتالیا) استفاده گردد حساسیت آزمون بالا می رود لذا پیشنهاد می شود بمنظور افزایش حساسیت و ویژگی آزمون مخلوطی از هر دو آنتی ژن در طراحی الایزا مورد استفاده قرار گیرد.

واژه های کلیدی: الایزا، آنتی ژن کپسید ویروس، ایمنوفلورسنس، ویروس اپشتن-بار.

مقدمه:

هرپس ویروس و در خانواده هرپس ویروس ها قرار دارد. در کشورهای فقیر و در حال توسعه عفونت

ویروس اپشتن-بار (Epstein-Barr virus-EBV) در جنس لنفو کریپتو ویروس و عضو زیر خانواده گاما

*نویسنده مسئول: اهواز- دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز- دانشکده پزشکی- بخش ویروس شناسی پزشکی -تلفن: ۳۷۲۳۸۱۳-۰۶۱۱.

EBV در اوایل زندگی اتفاق می افتد بطوری که در دهه اول زندگی ۱۰۰ درصد افراد آلوده می باشند که در اغلب آنها بدون علائم یا با علائم بیماری های تب دار خفیف همراه است اما در جوامع توسعه یافته بیش از ۵۰ درصد از عفونت اولیه تا دوران بلوغ و جوانی به تعویق می افتد و در نیمی از این موارد سبب ایجاد منونوکلئوز عفونی می گردد علاوه بر این ویروس اِپِشْتِن بار در ایجاد بدخیمی های متنوعی از جمله لنفوم بورکیت و کارسینوم نازوفارنکس نقش دارد (۲،۱). استراتژی های تشخیص عفونت EBV برای افراد دارای نقص ایمنی بدلیل مداخلات درمانی نسبت به افراد با ایمنی کامل متفاوت است (۳)، در افراد با ایمنی کامل مسئله اصلی تشخیص عفونت EBV بر مبنای شناسایی عفونت اولیه، عفونت گذشته و یا عدم آلودگی فرد به EBV می باشد (۴). بنابراین سرولوژی ملاک های منطقی را برای تفسیر نتایج فراهم می کند و با وجود اینکه سرولوژی EBV با تنوع زیادی همراه است آزمون های سرولوژی ترجیح داده می شوند. در آزمون هتروفل آنتی بادی تنها ۸۵ تا ۹۰ درصد از سرم فاز حاد بیماران بالغ و ۵۰ درصد سرم فاز حاد کودکان زیر ۵ سال دارای آنتی بادی هتروفل هستند (۵،۶) علاوه بر این آنتی بادی هتروفل ممکن است در افراد نرمال در غلظت پایین وجود داشته باشد (۷،۸). بنابراین میزان نسبتاً بالایی از نتایج منفی کاذب و تعدادی نتایج مثبت کاذب یافت می شود. آنتی بادی علیه آنتی ژن اولیه (Early Antigen-EA) عمدتاً نشان دهنده عفونت حاد می باشد اما تنها در ۶۰ تا ۸۰ درصد از بیماران حضور دارد (۹،۱۰،۱۱). آنتی بادی IgG علیه آنتی ژن EBNA-1 در اواخر عفونت تولید شده و اساساً برای تمام عمر باقی می ماند ولی تمام افراد به عفونت اولیه آنتی بادی علیه آن تولید نمی شود و کمتر برای تشخیص عفونت حاد استفاده می گردد و

آنتی بادی IgG علیه آنتی ژن EBNA-2 تنها در ۳۰ درصد از افراد در دوران حاد بیماری دیده می شود (۱۲،۱۳،۱۴،۱۵). آنتی بادی IgG علیه آنتی ژن کپسید ویروسی (Viral Capsid Antigen-VCA) در ۹۸ تا ۱۰۰ درصد سرم فاز حاد افراد با عفونت اولیه حضور دارد و بعد از بهبودی باقی می ماند (۱۴) و آنتی بادی IgM علیه VCA در ۹۰ تا ۹۴ درصد از بیماران در طی فاز حاد تولید می شود (۱۱،۱۳) بنابراین حداقل دو پارامتر سرولوژیکی VCA IgG و VCA IgM برای تشخیص آنتی بادی اختصاصی EBV و تعیین وضعیت عفونت در افراد با ایمنی کامل ضروری می باشد. اگر چه روش استاندارد برای تشخیص آنتی بادی IgG و IgM علیه EBV VCA روش ایمنوفلورسانس (IFA) می باشد ولی یکی از مشکلات این آزمون رنگ آمیزی غیر اختصاصی ایمنوفلورسانس است که معمولاً بدلیل حضور اتوآنتی بادی می باشد (۱۵) همچنین استاندارد کردن آن دشوار می باشد (۱۶) اما روش الایزا (Enzyme Linked Immunosorbent Assay-ELISA) آسان و سریع انجام می شود و برای تعداد زیادی نمونه و در مدت زمان کوتاه مورد استفاده قرار می گیرد و تفسیر آن آسان بوده و نیاز به افراد با تجربه ندارد و حساسیت آن نیز بالا است (۱۷). امروزه از آنتی ژن های مختلفی برای کویتینگ روی چاهک های الایزا در ساخت کیت های تجاری و یا تحقیقات برای شناسایی بهتر استفاده می شود. به طوری که Tranchand-Bunel و همکاران از آنتی ژن سنتتیک (۱۸)، Chan و همکاران از آنتی ژن نو ترکیب (۱۹) و Ho و همکاران از آنتی ژن اصلی برای تشخیص آنتی بادی های اختصاصی استفاده کردند (۲۰). در این پژوهش با استفاده از آنتی ژن gp125 کپسید ویروس اقدام به طراحی یک آزمون الایزا جهت تشخیص آنتی بادی های اختصاصی VCA IgG و VCA IgM ویروس اِپِشْتِن-بار گردید.

روش بررسی:

این مطالعه از نوع تحقیقی-تولیدی در موسسه تحقیقات، واکسن و سرم سازی رازی کرج و با همکاری شرکت تولیدی-تحقیقاتی تجاری پیشناز طب زمان تهران انجام گرفت. مراحل راه اندازی آزمون الایزا: الف- انتخاب آنتی ژن و میکروپلیت: ابتدا آنتی ژن کپسید ویروسی gp125 (Viral Capsid Antigen-VCA) از شرکت Virusys Corporation تهیه گردید و بنا به پیشنهاد این شرکت میکروپلیت های Nunc از جنس پلی استیرن (Nunc, MAXISOR, Denmark) برای پوشش دهی آنتی ژن انتخاب شد. ب- تعیین بهترین رقت آنتی ژن و سرم در آزمون الایزا: تعیین غلظت مناسب آنتی ژن برای پوشش دهی و بهترین رقت سرم و کنژوگه در آزمون الایزا به منظور شناسایی آنتی بادی های IgG و IgM اختصاصی VCA بطور جداگانه توسط روش تیتراسیون جدول متقاطع (Checker Board Titration or Chess Board Titration-CBT) و محاسبه میزان S/N (جذب نوری نمونه های سرمی مثبت به جذب نوری نمونه های سرمی منفی) تعیین گردید (۲۲،۲۱). بطور خلاصه در این روش آنتی ژن بصورت سریالی در طول میکروپلیت ها (از چپ به راست) از غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی لیتر تا ۰/۱۵ میکروگرم بر میلی لیتر در حجم ۵۰ میکرولیتر رقیق شد آنتی ژن در ابتدا در بافر کربنات/ بی کربنات ۵۰ میلی مولار با pH=۹/۶ برای پوشش دهی تهیه شد و بمدت یک شب (۲۰ ساعت) در دما ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد سپس محتویات میکروپلیت ها به یکباره تخلیه شده و هر یک از چاهک ها با بافر فسفات سالین (PBS) با pH=۷/۴ حاوی ۰/۰۵ درصد توین ۲۰ سه بار شسته شد و بعد از آخرین مرحله شستشو و تخلیه بافر شستشو از چاهک ها، بر روی کاغذ حوله ای محتویات احتمالی میکروپلیت ها تخلیه گردید (Tapping). سپس هر یک از چاهک ها با حجم ۲۵۰ میکرولیتر از بافر بلوکه کننده (Blocking Buffer) که شامل بافر PBS

با pH=۷/۴ حاوی ۲ درصد آلومین سرم گاو (BSA) بود پر شد و روی میکروپلیت ها با چسب مخصوص پوشانده شد و برای ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری گردید سپس محتویات چاهک ها تخلیه شد و مرحله شستشو تکرار گردید. در مرحله بعد نمونه های سرمی مثبت و نمونه های سرمی منفی بطور جداگانه از نظر آنتی بادی های IgG و IgM اختصاصی VCA در بافر رقیق کننده نمونه بصورت سریالی از ۱/۲۰ تا ۱/۱۲۸۰ (۲۴،۲۳،۲۲) رقیق شد. تمامی نمونه های سرمی در آزمون الایزا برای سنجش IgM اختصاصی VCA، در بافر رقیق کننده حاوی جذب کننده عامل روماتوئید (Goat anti-human; EUROSORB IgG/RF Absorbent) رقیق گردید ولی برای سنجش IgG اختصاصی VCA بافر رقیق کننده فاقد جذب کننده عامل روماتوئید بود، سپس پلیت برای ۱ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد مرطوب انکوبه گردید. بعد از زمان انکوباسیون مرحله شستشو تکرار شد سپس رقت ۱/۱۵۰۰۰ آنتی بادی کنژوگه (HRP-labeled Goat-Anti human IgM or IgG Rockland) به حجم ۱۰۰ میکرولیتر به هر چاهک اضافه گردید و برای ۱ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد مرطوب انکوبه شد، سپس مرحله شستشو تکرار گردید. سرانجام محلول سوبسترا/کروموژن (۱μl از محلول ۳۰٪ H₂O₂ / ۱mg از تترامیل بنزیدین (TMB) در ۱۰۰ml بافر سترات) به هر چاهک اضافه گردید و برای ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و تاریکی گذاشته شد سپس واکنش با افزودن محلول متوقف کننده HCl یک مولار، متوقف گردید و جذب نوری چاهک ها با دستگاه خوانشگر الایزا USA Anthos 2020 در طول ۴۵۰nm و با فیلتر ۶۲۰nm رفرنس قرائت و ثبت گردید (۲۲). ج- بعد از مرحله اولیه آماده سازی الایزا، مراحل انتخاب مناسب ترین بافر پوشش دهنده (Coating)، انتخاب مناسب ترین بافر بلوکه کننده (Blocking)، مناسب ترین

کازئین هیدرولیزت بود که پس زمینه کمتری را نشان داد.

نتیجه تعیین مناسب ترین رقت معرف ها:

بر اساس نتایج حاصل از تیتراسیون جدول متقاطع (CBT)، مناسب ترین مقدار آنتی ژن الصاق شده به فاز جامد برای تشخیص IgG و IgM بترتیب برابر ۱/۵ و ۲/۵ میکروگرم بر میلی لیتر و در حجم ۵۰ μl/well بود. همچنین بهترین رقت سرم بمنظور شناسایی VCA IgM، ۱/۴۰ و بمنظور شناسایی VCA IgG نیز ۱/۸۰ انتخاب گردید که این رقت ها بالاترین میزان S/N را داشتند. مناسب ترین تیتراژ آنتی بادی کتزوگه Goat Anti-human IgG or IgM رقت ۱/۱۶۰۰۰ انتخاب گردید، که کمترین میزان پس زمینه را داشت.

نتیجه تعیین مناسب ترین شرایط (زمانی و دمای) انکوباسیون میکروپلیت پس از افزودن مواد و معرفها: برای بهترین زمان و دما پوشش دهی مدت زمان ۲۰ ساعت در دما ۴ درجه سانتیگراد و بدنال آن ۱ ساعت در دمای اتاق در نظر گرفته شد. بالاترین حساسیت و اختلاف بین جذب نوری نمونه های مثبت و نمونه های منفی، مدت زمان ۱ ساعت در دما ۳۷ درجه سانتیگراد برای نمونه های سرمی و آنتی بادی کتزوگه دیده شد و مدت زمان ۳۰ دقیقه در دمای اتاق برای نگهداری محلول سوبسترا H2O2/کروموژن TMB بهترین شرایط نگهداری بود.

تعیین میزان حد آستانه (Cut off):

برای ۳۸ نمونه سرمی منفی برای تمایز نمونه های مثبت از نمونه های منفی در VCA IgM، میزان حد آستانه از جمع میانگین جذب نوری نمونه های منفی (۰/۱۴۱) با سه برابر انحراف معیار (SD) آن (SD=۰/۰۳۷) محاسبه گردید که برابر با ۰/۲۵ بود. از ۲۶ نمونه سرمی منفی بمنظور تمایز نمونه های مثبت از نمونه های منفی با VCA IgG، میزان حد آستانه از جمع میانگین جذب نوری

بافر رقیق کننده نمونه (Specimen Diluent) صورت گرفت. سپس نسبت به انتخاب مناسب ترین زمان و دمای پوشش دهی آنتی ژن، تعیین بهترین زمان و دمای انکوباسیون (Incubation) برای نمونه های سرمی و آنتی بادی کتزوگه و بهترین رقت آنها و همچنین مناسب ترین زمان افزودن محلول متوقف کننده اقدام گردید (۲۲). د- در مرحله بعد میزان حد آستانه (Cut off) برای تمایز نمونه های مثبت از نمونه های منفی، تیر نقطه پایانی، دقت یا تکرار پذیری آزمون الایزا و صحت آن و همچنین میزان همخوانی آن با آزمون IFA و کیت تجاری (Equipar Diagnostics - Italy) تعیین گردید. برای این منظور از ۱۰۱ نمونه سرمی برای آزمون الایزا IgM (۲۶ نمونه مثبت و ۷۵ نمونه منفی) و ۱۰۵ نمونه سرمی برای آزمون الایزا IgG (۹۸ نمونه مثبت و ۷ نمونه منفی) طراحی شده مورد آزمایش قرار گرفت و جهت بررسی ویژگی، ۲۴ نمونه سرم از بیماران غیر منونوکلئوز عفونی استفاده گردید. ه- آزمون ایمونوفلورسنس (IFA): در آزمون IFA از اسلایدهای حاوی سلولهای P3HR1 آلوده به EBV (شرکت Virusys Corporation) بر طبق دستورالعمل شرکت استفاده شد. همچنین از کشت سلول های B95.8 و تهیه سوسپانسیون سلولی برای این منظور استفاده گردید (۱۰). از نرم افزار SPSS و آزمون مک نمار جهت تجزیه و تحلیل داده ها استفاده گردید.

یافته ها:

نتیجه تعیین مناسب ترین معرف ها:

مناسب ترین بافر پوشش دهنده برای آنتی ژن VCA، بافر فسفات سالین (PBS) ده میلی مولار با pH=۷/۲ و مناسب ترین بافر بلوکه کننده بافر PBS حاوی ۲ درصد کازئین هیدرولیزت انتخاب گردید، که حساسیت بالاتری نسبت به بافر بلوکه کننده PBS حاوی ۲ درصد BSA و میزان S/N بالاتری را داشت. بهترین بافر رقیق کننده نمونه، PBS حاوی ۱ درصد

نمونه های منفی (۰/۱۶۱) با دو برابر انحراف معیار (SD) آن ($ISD=0/042$) بدست آمد که برابر با ۰/۲۵ بود.

نتیجه تعیین دقت یا تکرار پذیری آزمون *EBV VCA IgM ELISA*

میانگین ضریب تغییرات (CV) دقت درون سنجی برای نمونه سرمی مثبت متوسط ۴/۱ درصد، مثبت ضعیف ۶/۶ درصد، نمونه منفی ۵/۸ درصد و میانگین ضریب تغییرات (CV) دقت میان سنجی برای نمونه سرمی مثبت متوسط ۱۰/۸ درصد، مثبت ضعیف ۱۱/۹ درصد، نمونه منفی ۷/۹۴ درصد بود که بیانگر تکرار پذیری بالا آزمون است.

نتیجه تعیین دقت یا تکرار پذیری آزمون *EBV VCA IgG ELISA*

میانگین ضریب تغییرات (CV) دقت درون سنجی برای نمونه سرمی مثبت بالا ۶/۷۷ درصد، نمونه سرمی مثبت متوسط ۷/۱۳ درصد، مثبت ضعیف ۵/۱۳ درصد، نمونه منفی ۶/۱۸ درصد و میانگین ضریب تغییرات (CV) دقت میان سنجی برای نمونه مخلوط سرمی مثبت ۸/۰۵ درصد و نمونه مخلوط سرمی منفی ۱۴/۵ درصد بود که بیانگر تکرار پذیری قابل قبول آزمون است.

نتیجه تعیین ویژگی آزمون *EBV VCA IgM ELISA*: بدین منظور از دو پارامتر استفاده شد. الف)

استفاده از محلول ۲-مرکاپتواتانول (2ME) در PBS: در این روش دامنه جذب نوری نمونه های مثبت قبل از ترکیب با 2ME برابر ۰/۹۳ تا ۲، در حالی که بعد از ترکیب با 2ME برابر ۰/۱۶ تا ۰/۲۸ شد. ب- بررسی واکنش متقاطع (Cross reactivity) با دیگر هرپس ویروس ها، (ویروس سیتومگالو، واریسلا زوستر و هرپس سیمپلکس تیپ ۱) نشان داد که هیچ واکنش متقاطعی بین دیگر ویروس های خانواده هرپس با EBV در آزمون الایزا وجود ندارد.

تعیین نقش عامل روماتوئید در ایجاد نتایج مثبت کاذب در *EBV VCA IgM ELISA*

در نمونه های سرمی رقیق شده در محلول

رقیق کننده نمونه حاوی جذب کننده عامل روماتوئید، دامنه جذب نوری از ۰/۲۳ تا ۰/۸۱ به ۰/۱۵ تا ۰/۲۴ کاهش یافت.

تداخلات در آزمون الایزا:

در این مطالعه دو نمونه سرمی منفی که شدیداً لیپمیک بودند، جذب نوری ۰/۳۰۱ و ۰/۳۸۵ را نشان دادند که بیانگر تداخل در آزمون الایزا می باشد.

بررسی صحت آزمون الایزا *EBV VCA IgM* با کیت الایزا تجاری:

آزمون الایزا طراحی شده در مقایسه با کیت تجاری دارای ۹۲ درصد حساسیت نسبی، ۹۶ درصد ویژگی نسبی، میزان همخوانی ۹۵ درصد و ارزش اخباری مثبت و منفی به ترتیب ۸۸/۹ و ۹۷/۳ درصد بود که اختلاف معنی داری بین الایزا طراحی شده و کیت تجاری وجود نداشت (ضریب کاپا=۰/۸۷۲ و $P=1$). در نتیجه دو آزمون به یک اندازه مناسب هستند. از ۵ نمونه که در دو آزمون الایزا طراحی شده و الایزا تجاری دارای نتایج متفاوتی بودند ۳ تا از نمونه ها در محدوده مشکوک الایزا طراحی شده قرار داشتند که به عنوان مثبت در نظر گرفته شده بودند.

مقایسه صحت آزمون الایزا طراحی شده *EBV VCA IgG* و تعیین میزان همخوانی با آزمون ایمنوفلورسانس (IFA) و کیت الایزا تجاری:

آزمون الایزا طراحی شده *EBV VCA IgG* زمانی که با آزمون IFA (به عنوان آزمون مرجع) مقایسه گردید بترتیب حساسیت ۹۷ درصد، ویژگی ۱۰۰ درصد و میزان همخوانی ۹۷/۱ درصد را نشان داد که اختلاف معنی داری بین الایزا طراحی شده و آزمون IFA وجود نداشت (ضریب کاپا=۰/۸۰۹ و $P=0/248$)، همچنین الایزا طراحی شده در مقایسه با کیت تجاری دارای ۹۶/۶ درصد حساسیت نسبی و ۸۸/۹ درصد ویژگی نسبی، میزان همخوانی ۹۵ درصد، ارزش اخباری مثبت ۷/۹۷ درصد و ۲/۸۲ درصد ارزش اخباری منفی که اختلاف معنی داری بین الایزا طراحی شده و الایزا

تجاری وجود نداشت (ضریب کاپا=۰/۸۳۶ و $P=1$).

بحث:

پاسخ اختصاصی علیه ویروس اپشتن بار نقش مهمی در افتراق عفونت اولیه و عفونت گذشته، از افراد غیر آلوده دارد، همچنین نقش مهمی در افتراق عفونت اولیه EBV از سایر بیماری‌هایی که با تب، لنفوسیتوز، لنفونوپاتی و بیحالی همراه هستند یا عواملی که باعث بیماری شبه منوکلئوز عفونی می‌شوند، دارد (۱،۱۴،۲۵). آزمون‌هایی که بمنظور بررسی غیر مستقیم عفونت EBV برای تعیین حضور آنتی بادی‌هایی که علیه آنتی ژن‌های اختصاصی ویروس بکار می‌روند شامل: آنالیز وسترن بلات، آزمون اویدیتی، آزمون IFA، آزمون آنتی کمپلمان ایمنوفلورسانس (ACIF) و آزمون‌های آنزیم ایمنواسی (EIA) می‌باشد (۱۴). جهت تشخیص عفونت ویروس اپشتن بار بوسیله آزمون الایزا آنتی ژن‌های ویروسی متفاوتی برای اتصال به فاز جامد استفاده می‌شود (۴،۷). آنتی بادی از کلاس IgM و IgG علیه آنتی ژن VCA در تشخیص عفونت اولیه و گذشته نقش دارد و در صورتی که نتایج VCA IgM به تنهایی و یا هر دو مارکر همزمان با هم مثبت باشند بیانگر عفونت اولیه است و اگر تنها VCA IgG مثبت باشد نشان دهنده عفونت گذشته است و در صورتی که هر دو مارکر منفی باشد بیانگر عدم آلودگی است (۱۴). در این تحقیق آزمون الایزا برای تشخیص آنتی بادی‌های IgG و IgM علیه آنتی ژن کپسید (gp125) ویروس اپشتن بار طراحی و راه اندازی و با کیت تجاری الایزا و آزمون IFA مقایسه گردید. بمنظور افزایش حساسیت و ویژگی تست‌های سرولوژیکی، باید از آنتی ژن‌های مختص و اختصاصی استفاده شود. بدین منظور در این تحقیق از آنتی ژن کپسید ویروسی برای اتصال به فاز جامد استفاده شد. این آنتی ژن ممکن است بصورت پروتئین اصلی (Native protein) تخلیص شده، پروتئین نوترکیب و

پپتیدهای سنتتیک باشد (۴،۷).

آنتی ژن‌های اصلی بر خلاف دیگر آنتی ژن‌ها دارای ساختمان سوم پروتئین و تغییرات اختصاصی می‌باشند. تغییرات بعد از ترجمه بعنوان مثال گلیکوزیلاسیون که در ایجاد و تولید اپی توپ‌هایی که بوسیله آنتی بادی‌ها شناسایی می‌شوند، بسیار با اهمیت است (۲۶). همچنین در مطالعه‌ای که توسط Gartner و همکاران انجام گرفت، چهار کیت الایزا تجاری با آزمون رفرانس IFA مقایسه گردید و مشخص شد که استفاده از آنتی ژن اصلی کپسید (gp125) که با روش ایمنوفینیتی تخلیص شده بود نسبت به پپتیدهای سنتتیک (P18) و آنتی ژن‌های نوترکیب دارای بالاترین میزان همخوانی با متد رفرانس IFA می‌باشد (۴). به دلیل اینکه پروتئین‌های نوترکیب اکثراً در باکتری *E. coli* بیان می‌شوند، بنابراین در طی تخلیص، احتمال آلودگی با پروتئین‌های باکتریایی نیز وجود دارد و متعاقباً منجر به بروز نتایج مثبت کاذب با نمونه‌های سرمی حاوی آنتی بادی علیه *E. coli* خواهد گردید. بنابراین در این تحقیق از آنتی ژن‌های اصلی برای اتصال به فاز جامد استفاده شد. در این تحقیق به منظور اتصال آنتی ژن به فاز جامد، دو نوع بافر پوشش دهنده مورد بررسی قرار گرفت. بر خلاف بسیاری از مقالات (۱۸،۱۹) که از بافر کربنات/بی کربنات پنجاه میلی مولار برای اتصال آنتی ژن کپسید به فاز جامد استفاده کرده بودند، در این بررسی بهترین بافر پوشش دهنده بافر فسفات سالین ده میلی مولار انتخاب گردید که در این بافر نمونه‌های مثبت جذب نوری بالاتری را نشان می‌دهند و از طرفی بافری است که تقریباً دارای pH برابر با ۱ واحد بالاتر از نقطه ایزوالکتریک پروتئین اتصالی باشد که از این لحاظ برای پوشش دهی بسیار ایده‌آل است (۲۲). زمان و دمای مناسب برای اتصال آنتی ژن به فاز جامد (Coating) نیز از مسائل مهم است، علیرغم پیشنهاد شرکت Virusys مبنی بر انکوباسیون پلیت برای یک ساعت در دمای ۳۷ درجه

سانتیگراد این روش، روش مطلوبی نبود در حالی که انکوباسیون در دمای ۴ درجه سانتیگراد برای ۲۰ ساعت و بدنال آن یک ساعت در دمای اتاق با نتایج مطلوبی همراه بود (۲۲، ۱۹، ۱۸). مقدار آنتی ژن الصاق شده به فاز جامد برای تشخیص IgG و IgM بترتیب برابر ۱/۵ و ۲/۵ میکروگرم بر میلی لیتر و در حجم ۵۰ μl/well بود و در غلظت های بالاتر و پایین تر آنتی ژن میزان حساسیت و مقدار S/N کاهش می یابد. در مطالعات Tranchand-Bunel و همکاران (۱۸) و Chan و همکاران (۱۹) برای تشخیص IgM به ترتیب مقدار ۱ میکروگرم آنتی ژن سنتتیک و ۳ میکروگرم آنتی ژن نو ترکیب الصاق شده است. در الایزا به منظور کاهش اتصالات غیر اختصاصی و پر کردن فضا های خالی بعد از مرحله پوشش دهی مرحله بلوکه کردن انجام می شود (۲۲). در این تحقیق جهت بلوکه کردن از دو نوع بافر بلوکه کننده BSA و کازئین استفاده شد. در آزمون الایزا از بافر بلوکه کننده حاوی کازئین که کمترین واکنش های غیر اختصاصی را نشان می داد استفاده شد که نتایج با Robertson و همکاران و مطالعه Vogt و همکاران نیز همخوانی دارد (۲۸، ۲۷).

در این مطالعه واکنش متقاطع میان ویروس اپشتن بار و دیگر ویروس های خانواده هرپس دیده نشد که بیانگر ویژگی بالا آزمون است و با مطالعات Ho و همکاران همخوانی داشت که بدلیل اختصاصیت آنتی ژن می باشد (۲۰). از عواملی که در تشخیص آنتی بادی IgM اختصاصی VCA در آزمون الایزا تداخل می کنند عامل روماتوئید (Factor Rheumatoid) و تیر بالای IgG اختصاصی می باشد که به ترتیب باعث ایجاد نتایج مثبت کاذب و منفی کاذب می شوند. فاکتور روماتوئید (RF) عموماً آنتی بادی از کلاس IgM بوده و یکی از جدی ترین مشکلات در ارزیابی IgM اختصاصی در آزمون الایزا می باشد که با اتصال به قسمت ثابت آنتی بادی IgG منجر به ایجاد نتایج

کاذب می گردد (۳۲-۲۹). چندین تکنیک برای حذف این مشکل وجود دارد. یکی از این تکنیک ها استفاده از پروتئین A باکتری استافیلوکوکوس اورئوس است که وابستگی بالایی برای قسمت Fc آنتی بادی IgG دارد اما قادر به حذف IgG3 نمی باشد و همچنین مشخص شده که تا ۶۰ درصد از آنتی بادی های IgM نیز با این روش حذف می شود (۳۴، ۳۳، ۳۱). از دیگر تکنیک های حذف IgG استفاده از کروماتوگرافی تعویض یونی (Anion-exchange chromatography) و اولترا سانتریفیوژ روی گرادایانت می باشد. اما هر دو این تکنیک ها وقت گیر بوده و نمونه های سرمی در این روشها رقیق می شود (۳۵). علاوه بر این در روش کروماتوگرافی تعویض یونی IgG3 حذف نشده و همچنین مقداری از آنتی بادی های IgM با این روش حذف می شود (۲۹). IgG دناتوره انسان نیز برای این منظور استفاده می شود، به هر حال این روش ها نیاز به مرحله سانتریفیوژ دارد و تنها بطور نسبی RF را حذف می کند (۳۵). همچنین از پروتئین نو ترکیب G استرپتوکوک نیز برای این منظور استفاده می شود، که این روش نیز نیاز به مرحله سانتریفیوژ دارد و قابلیت اتوماسیون شدن را ندارد (۲۹). استفاده از goat anti-human IgG ارزان بوده و نیاز به مرحله سانتریفیوژ ندارد و قادر است میزان ۱۵ mg/ml از IgG انسان را حذف نماید که این میزان بیش از محدوده نرمال IgG در سرم می باشد، در این تحقیق مشخص گردید که بعد از رقیق کردن نمونه ها در بافر رقیق کننده حاوی جذب کننده عامل روماتوئید، تداخلی در آزمون الایزا ایجاد نمی شود و هیچ نتایج کاذبی بدلیل عامل روماتوئید ایجاد نمی شود و نتایج با مطالعه Ho و همکاران نیز همخوانی دارد (۲۰). میزان جذب نوری نمونه های مثبت بعد از ترکیب شدن با 2ME به شکل معنی داری کاهش یافته است در حالی که جذب نوری نمونه های منفی قبل و بعد از ترکیب با 2ME تفاوتی با هم نداشت که

بیانگر ویژگی بالا آزمون ELISA VCA IgM می باشد. حساسیت و ویژگی نسبی آزمون الایزا طراحی شده VCA IgM در مقایسه با کیت تجاری به ترتیب برابر ۹۲ و ۹۶ درصد و میزان همخوانی بین دو آزمون ۹۵ درصد (ضریب کاپا=۰/۸۷۲) بود و میزان دقت درون سنجی و میان سنجی بطور کلی برابر ۸/۳۹ درصد بود که با بسیاری از کیت های تجاری همخوانی دارد و بیانگر تکرار پذیری بالا آزمون است. حساسیت و ویژگی نسبی آزمون الایزا IgG طراحی شده در مقایسه با کیت تجاری به ترتیب برابر ۹۶/۵ و ۸۹ درصد و میزان همخوانی بین دو آزمون ۹۵ درصد (ضریب کاپا=۰/۸۳۶) بود، میزان ۵ درصد اختلاف میان دو آزمون احتمالاً مربوط به تفاوت در آنتی ژن متصل شده به فاز جامد است (آنتی ژن استفاده شده در کیت تجاری VCA سنتتیک است). حساسیت و ویژگی آزمون الایزا IgG طراحی شده با آزمون IFA به ترتیب برابر با ۹۷ و ۱۰۰ درصد و میزان همخوانی بین دو آزمون برابر با ۹۷ درصد (ضریب کاپا=۰/۸۰۹) بود. آزمون الایزا طراحی شده زمانی که با آزمون IFA (بعنوان آزمون مرجع) مقایسه می شود دارای ارزش اخباری مثبت ۱۰۰ درصد است. در حالی که کیت الایزا تجاری زمانی که با آزمون IFA مقایسه می گردد ویژگی پایین تر اما حساسیت بالاتر را نسبت به الایزا طراحی شده نشان می دهد که بدلیل ماهیت آنتی ژن پوشش داده شده می باشد. بمنظور تعیین دقت از نمونه های سرمی مثبت ضعیف، مثبت متوسط و شدیداً مثبت استفاده شد تا بتوان نتایج را به کل نمونه ها تعمیم داد. در این تحقیق کمترین درصد CV را نمونه شدیداً مثبت نشان داد میانگین دقت درون سنجی و میان سنجی برای سنجش IgG برابر با ۶/۷۵ درصد بود که بیانگر تکرار پذیری بالا آزمون است. مقایسه نتایج الایزا طراحی شده با آزمون IFA و آزمون تجاری الایزا بیانگر حساسیت، ویژگی، همخوانی بالا الایزا طراحی شده می باشد. گرچه روش استاندارد طلایی برای تشخیص

آنتی بادی علیه EBV VCA روش IFA می باشد و دارای ویژگی بالایی است اما یکی از مشکلات این آزمون رنگ آمیزی غیر اختصاصی ایمونوفلورسانس است که معمولاً بدلیل حضور اتوآنتی بادی می باشد (۱۵). این روش نیازمند کشت سلولی بوده و در نتیجه مشکلات کشت سلولی نیز وجود دارد، همچنین استاندارد کردن آن بدلیل وجود تعداد متنوعی از سلول های تولید کننده آنتی ژن در لاین های سلولی مثبت، دشوار می باشد (۱۶). علاوه بر این آزمون IFA خصوصاً در مطالعات اپیدمیولوژی که تعداد زیادی نمونه بایستی بررسی گردد، همچنین انجام آن نیاز به اشخاص ماهر و باتجربه و تجهیزات گران قیمت دارد (۴، ۲۰، ۳۶). روش الایزا بمنظور تشخیص عفونت ویروس اپشتن بار دارای مزایایی از قبیل سادگی، دقت و حساسیت بالا، سریع و بی خطر بودن، پایداری و در دسترس بودن معرف ها، ارزان و قابل قبول بودن، تنوع و قرائت آسان نتایج و قابلیت اتوماسیون می باشد (۴، ۲۰، ۲۲). علاوه بر این در پژوهش مشخص شد که آزمون الایزا طراحی شده دارای میزان همخوانی بالایی با آزمون IFA می باشد، بنابراین می تواند جانشین مناسبی برای این آزمون باشد.

نتیجه گیری:

آزمون الایزا طراحی شده برای تشخیص IgG و IgM علیه آنتی ژن کپسید EBV زمانی که با کیت الایزا تجاری و آزمون IFA مقایسه شد دارای حساسیت نسبی، ویژگی نسبی، همخوانی و تکرار پذیری بالایی بود و هیچگونه واکنش متقاطع میان ویروس اپشتن بار و دیگر ویروس های خانواده هرپس مشاهده نگردید. کیت تجاری زمانی که با آزمون IFA مقایسه می گردد ویژگی پایین تر اما حساسیت بالاتری را نسبت به الایزا طراحی شده نشان می دهد که بدلیل ماهیت آنتی ژن پوشش داده شده می باشد. نتایج ما نشان داد زمانی که در روش الایزا از آنتی ژن اصلی تخلیص شده از سلول های آلوده به ویروس استفاده شود آزمون ویژگی بالایی خواهد داشت اما

تشکر و قدردانی:

بدین وسیله از شرکت تولیدی-تحقیقاتی پیشناز طب زمان بدلیل تامین هزینه های این تحقیق و از همکاری بخش بیوتکنولوژی موسسه رازی تشکر و قدردانی می گردد.

زمانی که از آنتی ژن های سنتتیک استفاده گردد حساسیت آزمون بالا می رود لذا پیشنهاد می شود بمنظور افزایش حساسیت و ویژگی آزمون مخلوطی از هر دو آنتی ژن در طراحی آزمون الایزا مورد استفاده قرار گیرد.

منابع:

1. Kieff E, Rickinson AB. Epstein-Barr virus and replication. In: Knipe DM, Howley PM, Griffin DE, Martin MA, Lamb RA, Roizman B. Fields virology. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p: 2604-700.
2. Brooks GF, Butel JS, Morse SA. Javvetz medical microbiology. 23rd ed. NewYork: McGraw-Hill Pub; 2010. p: 643-7.
3. Gartner BC, Kortmann K, Schafer M, Mueller-Lantzsch N, Sester U, Kaul H, et al. No correlation in Epstein-Barr virus reactivation between serological parameters and viral load. J Clin Microbiol. 2000; 38(6): 2458.
4. Gartner BC, Hess RD, Bandt D, Kruse A, Rethwilm A, Roemer K, et al. Evaluation of four commercially available Epstein-Barr virus enzyme immunoassays with an immunofluorescence assay as the reference method. Clin Diagn Lab Immunol. 2003; 10(1): 78-82.
5. Lennette ET. Epstein-Barr virus (EBV). In: Lennette EH, Lennette DA, Lennette ET. Diagnostic procedures for viral, rickettsial, and chlamydial infections. 7th ed. Washington D.C: Am Pub Health Assoc; 1995. p: 299-312.
6. Gutierrez J, Sorlózano A, Soto MJ, Maroto C. Microbiological diagnosis of infection by the Epstein-Barr virus: pathogenic basis [dissertation]. Spain, Granada: University of Granada; 2009.
7. Svahn A, Magnusson M, Jagdahl L, Schloss L, Kahlmeter G, Linde A. Evaluation of three commercial enzyme-linked immunosorbent assays and two latex agglutination assays for diagnosis of primary Epstein-Barr virus infection. J Clin Microbiol. 1997; 35(11): 2728-32.
8. Godshall SE, Kirchner JT. Infectious mononucleosis. Complexities of a common syndrome. Postgrad Med. 2000; 107(7): 175-9, 83-4, 86.
9. Turgeon ML. Immunology & Serology in laboratory medicine. 2nd ed. NewYork: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1996.
10. Lennete ET, Murry PR, Baron EJ, Jorgenson JH, Pfaller MA, Tenenbaum PH. Manual Of Clinical Microbiology. 7th ed. Washington: ASM Press; 2000. p: 905-10.
11. Fleisher GR, Collins M, Fager S. Limitations of available tests for diagnosis of infectious mononucleosis. J Clin Microbiol. 1983; 17(4): 619-24.
12. Bauer G. Simplicity through complexity: immunoblot with recombinant antigens as the new gold standard in Epstein-Barr virus serology. Clin Lab. 2001; 47(5-6): 223-30.
13. Linde A. Epstein-barr virus. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgenson JH, Pfaller MA, Tenenbaum RH. Manual of clinical microbiology. 8th ed. Washington: ASM Press; 2003. p: 1331-40.
14. Hess RD. Routine Epstein-Barr virus diagnostics from the laboratory perspective: still challenging after 35 years. J Clin Microbiol. 2004; 42(8): 3381-7.

15. Klein G, Clifford P, Klein E, Smith RT, Minowada J, Kourilsky FM, et al. Membrane immunofluorescence reactions of Burkitt lymphoma cells from biopsy specimens and tissue cultures. *J Natl Cancer Inst.* 1967; 39(5): 1027-44.
16. Hotchin NA, Crawford DH. The diagnosis of Epstein-Barr viruse-associated disease. In: Morgan-Capner P. *Current Topics in Clinical Virology*. London: Laversham Press; 1991. p: 115-40.
17. Dolken G, Weitzmann U, Boldt C, Bitzer M, Brugger W, Lohr GW. Enzyme-linked immunosorbent assay for IgG antibodies to Epstein-Barr virus-associated early antigens and viral capsid antigen. *J Immunol Methods.* 1984; 67(2): 225-33.
18. Tranchand-Bunel D, Gras-Masse H, Bourez B, Dedecker L, Auriault C. Evaluation of an Epstein-Barr virus (EBV) immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assay using a synthetic convergent peptide library, or mixotope, for diagnosis of primary EBV infection. *J Clin Microbiol.* 1999; 37(7): 2366-8.
19. Chan KH, Luo RX, Chen HL, Ng MH, Seto WH, Peiris JS. Development and evaluation of an Epstein-Barr virus (EBV) immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assay based on the 18-kilodalton matrix protein for diagnosis of primary EBV infection. *J Clin Microbiol.* 1998; 36(11): 3359-61.
20. Ho DW, Field PR, Cunningham AL. Rapid diagnosis of acute Epstein-Barr virus infection by an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for specific immunoglobulin M (IgM) antibody without rheumatoid factor and specific IgG interference. *J Clin Microbiol.* 1989; 27(5): 952-8.
21. WWW.kpl.com. Technical guide for ELISA: protocols, troubleshooting. In: Crowther JR. *The ELISA Guide book*. Newjersey: Klumana Press; 2001.
22. Crowther JR. *The ELISA guide book*. Newjersey: Klumana Press; 2001.
23. Coligan JE, Bierer B, Margulies DH, Shevach EM, Strober W, Coico R. *Current protocols in immunology*. NewYork: John Wiley & Sons Inc; 2004.
24. Rowell V. *Nunc Guid to solid phase*. Nunc brand product. NewYork: Cold Spring Harbor; 1970.
25. Linderholm M, Boman J, Juto P, Annika L. Comparative of nine kits for rapid diagnosis of infectious mononucleosis and Epstein Barr virus-specific serology. *J Clin Micribiol.* 1994; 32 (1): 259-61.
26. Pearson GR. ELISA tests and monoclonal antibodies for EBV. *J Virol Methods.* 1988; 21(1-4): 97-104.
27. Robertson PW, Whybin LR, Cox J. Reduction in non-specific binding in enzyme immunoassay using casein hydrolysate in serum diluents. *J Immunol Methods.* 1985 Jan; 76(1): 195-7.
28. Vogt RF Jr, Phillips DL, Henderson LO, Whitfield W, Spierto FW. Quantitative differences among various proteins as blocking agent for ELISA microtiter plate. *J Immunol Meth.* 1987; 101(1): 43-50.
29. Martins TB, Jaskowski TD, Mouritsen CL, Hill HR. An evaluation of the effectiveness of three immunoglobulin G (IgG) removal procedures for routine IgM serological testing. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1995; 2(1): 98-103.
30. Salonen EM, Vaheri A, Suni J, Wager O. Rheumatoid factor in acute viral infections: interference with determination of IgM, IgG, and IgA antibodies in an enzyme immunoassay. *J Infect Dis.* 1980; 142(2): 250-5.

31. Champsaur H, Fattal-German M, Arranhado R. Sensitivity and specificity of viral immunoglobulin M determination by indirect enzyme-linked immunosorbent assay. *J Clin Microbiol.* 1988; 26(2): 328-32.
32. Kimmel N, Friedman MG, Sarov I. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of herpes simplex virus-specific IgM antibodies. *J Virol Methods.* 1982; 4(4-5): 219-27.
33. Field PR, Shanker S, Murphy AM. The use of protein A-sepharose affinity chromatography for separation and detection of specific IgM antibody in acquired rubella infection: a comparison with absorption by staphylococci containing protein A and density gradient ultracentrifugation. *J Immunol Methods.* 1980; 32(1): 59-70.
34. Kronvall G, Williams RC Jr. Differences in anti-protein A activity among IgG subgroups. *J Immunol.* 1969; 103(4): 828-33.
35. Cerny EH, Farshy CE, Hunter EF, Larsen SA. Rheumatoid factor in syphilis. *J Clin Microbiol.* 1985; 22(1): 89-94.
36. Svahn A, Magnusson M, Jägdahl L, Schloss L, Kahlmeter G, Linde A. Evaluation of three commercial enzyme linked immunosorbent assay and two latex agglutination assays for diagnosis of primary Epstein Barr virus infection. *J Clin Microbiol.* 1997 Nov; 35(11): 2728-32.

Development and evaluation of indirect enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) to detect Epstein-Barr virus infection based on gp125 viral capsid antigen

Taherkhani R (PhD)^{1*}, Mirjalili A (PhD)², Farshadpoor F (PhD)¹, Kargar-Mokhar R (PhD)³, Botorabi SM (PhD)⁴, Abdizadeh R (PhD)⁵

¹Infectious and Tropical Diseases Research Center, Ahvaz Jondishapour University of Medical Sciences, Ahvaz, I.R. Iran; ²Biotechnology Dept., Razi Vaccine & Serum Research Institute, Alborz, I.R. Iran; ³Virology Dept., Razi Vaccine & Serum Research Institute, Alborz, I.R. Iran;

⁴Pishtaz Teb Zaman Commercial kit producing company, Tehran, I.R. Iran; ⁵Parasitology Dept., JundiShapor University of Medical Sciences, Ahavas, I.R. Iran.

Received: 6/Nov/2011

Revised: 12/Jul/2012

Accepted: 7/Oct/2012

Background and aims: Epstein-Barr virus is a member of the herpesviridae family which is spreaded by direct contact with infectious secretion. Serum IgM and IgG are antibodies to the Viral Capsid Antigen (VCA) which appear during infection and Involve in determining the infection status. The aim of this study is to design and evaluate Epstein Barr Virus (EBV) IgM and IgG indirect ELISA using gp125 Viral Capsid antigen for diagnosis of EBV infection.

Methods: In this study, ELISA test using Viral Capsid Antigen (gp125) for detection of EBV-specific IgG and IgM antibodies was designed and launched. To evaluate our home-made ELISA, 101 human sera (26 positive sera and 75 negative sera) were tested with VCA IgM ELISA and 105 human sera (98 positive sera and 7 negative sera) were tested with VCA IgG ELISA. To determine the specificity, 24 serum samples from patients without mononucleosis infection were used. The samples were simultaneously evaluated for VCA IgG and VCA IgM by commercial ELISA kit and with the indirect IF test. Data were analyzed using SPSS software version 15 and McNemar test.

Results: Our results displayed the relative sensitivity, relative specificity and agreement of 92%, 96% and 95% respectively for the VCA IgM ELISA and the relative sensitivity, relative specificity and agreement of 96.6%, 88.9% and 95% respectively for the VCA IgG ELISA when compared with commercial ELISA kit. VCA IgG ELISA showed 97% sensitivity, 100% specificity and 97.1% agreement when compared with indirect IF and the 100% positive declarative value.

Conclusion: Nature of the coated antigen has an important role in increasing the sensitivity and specificity. In other words, when the native antigen (Our home-made ELISA) is used in the ELISA test, the test has a high specificity but when the synthetic antigen (ELISA kits from Equipar Diagnostics -Italy) is used the sensitivity will go up, so increasing the sensitivity and specificity of the test it is recommended to use, both antigens in the ELISA design.

Keywords: Epstein-Barr virus, ELISA, Viral capsid antigen, Immunofluorescence.

Cite this article as: Taherkhani R, Mirjalili A, Farshadpoor F, Kargar-Mokhar R, Botorabi SM, Abdizadeh R. Development and evaluation of indirect enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) to detect Epstein-Barr virus infection based on gp125 viral capsid antigen. J Sharekord Univ Med Sci. 2012 Dec, Jan; 14(5): 42-53.

*Corresponding author:

Virology Dept., Infectious and Tropical Diseases Research Center, Ahvaz Jondishapour University of Medical Sciences, Ahvaz, I.R. Iran; Tel: 00986113738313, E-mail:taherkanireza2005@yahoo.com